

PCT/JP 99/00954  
EJV

26.02.99

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D	16 APR 1999
WIPO	PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1998年 2月27日

出 願 番 号  
Application Number:

平成10年特許願第048187号

出 願 人  
Applicant(s):

株式会社ディナベック研究所

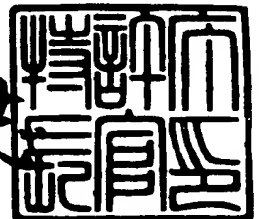
**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 4月 2日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

佐山 建志



出証番号 出証特平11-3019500

【書類名】 特許願

【整理番号】 D3-001

【提出日】 平成10年 2月27日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明の名称】 負電荷物質を輸送するための組成物

【請求項の数】 12

【発明者】

    【住所又は居所】 静岡県清水市川原町 21-11 教職員住宅 302号

    【氏名】 奥 直人

【発明者】

    【住所又は居所】 愛知県名古屋市昭和区川名山町 128-4 枳中住宅 1-11

    【氏名】 南後 守

【特許出願人】

    【識別番号】 595155107

    【氏名又は名称】 株式会社ディナベック研究所

    【代表者】 中富 博隆

【代理人】

    【識別番号】 100102978

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

    【識別番号】 100108774

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 041092

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9706980

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

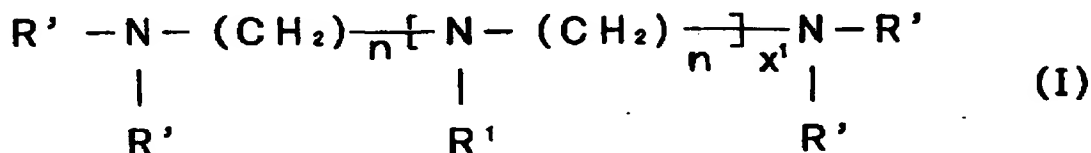
【発明の名称】 負電荷物質を輸送するための組成物

【特許請求の範囲】

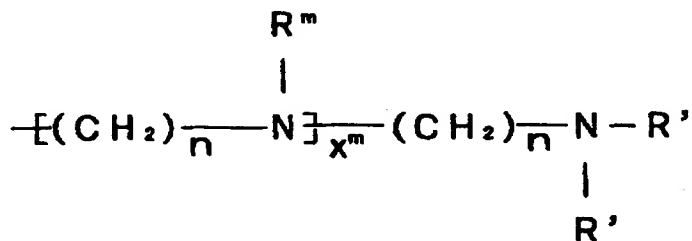
【請求項 1】 疎水性基が一分子中に 2 個以上導入されたポリアルキレンイミンまたはその塩を含む組成物。

【請求項 2】 疎水性基がコレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、またはリン脂質残基である、請求項 1 に記載の組成物。

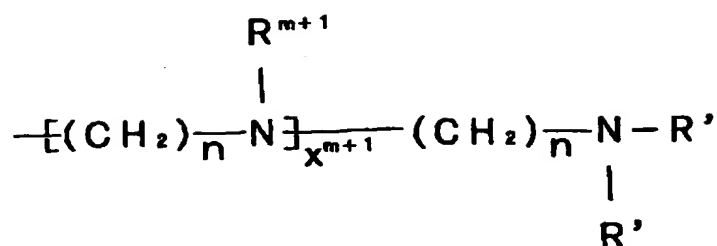
【請求項 3】 疎水性基が一分子中に 2 個以上導入されたポリアルキレンイミンが下記構造式(I)で表される化合物である、請求項 1 に記載の組成物。



(式中、R' は、水素、アルキロキシ基、またはアルコキシ基を表し、同一の窒素原子に結合する 2 つの R' は同一であっても異なってもよく、R<sup>1</sup> は水素、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、リン脂質残基、または次式を表し、



R<sup>m</sup> は水素、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、リン脂質残基、または次式を表す。



また、式中、 $n$ 、 $x^1$ 、 $x^m$ および $x^{m+1}$ は自然数を表す。）

【請求項 4】 ポリアルキレンイミンがポリエチレンイミンである、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 5】 さらにリン脂質を含む、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 6】 リン脂質が中性リン脂質または酸性リン脂質である、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 7】 リン脂質がホスファチジルエタノールアミン骨格またはホスファチジルコリン骨格を有する、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 8】 リン脂質がジオレイルホスファチジルエタノールアミンまたはホスファチジルコリンである、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】 負電荷を有する生理活性物質と請求項 1 から 8 のいずれかに記載の組成物を含む複合体。

【請求項 10】 負電荷を有する生理活性物質が核酸またはその誘導体である、請求項 10 に記載の複合体。

【請求項 11】 請求項 9 または 10 に記載の複合体を細胞に接触させる工程を含む、負電荷を有する生理活性物質を細胞内へ導入する方法。

【請求項 12】 請求項 5 に記載の組成物を製造するための、リン脂質および疎水性基が一分子中に 2 個以上導入されたポリアルキレンイミンまたはその塩を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、負電荷物質を細胞内へ輸送するための組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】

薬物治療において、薬物を目的とする細胞又は細胞内組織に到達させるシステム、すなわちドラッグデリバリーシステム (Drug Delivery System; 以下単に「DDS」と称する) は重要な技術である。遺伝子治療においても、DDSを利用して遺伝子を所望の細胞に導入することが中心的な技術であることは言うまでもない。細胞内に遺伝子を導入するための方法は大きく二つに分類することができる。

【0003】

一つは、ウイルスベクターを用いる方法である。これには、所望の外来性遺伝子をゲノム上に有するウイルスを感染させることにより、内部の核酸を細胞内に導入するという方法が含まれる。もう一つは、人工的なまたは半人工的な輸送担体 (キャリアー) に、所望の遺伝子または該遺伝子を含むベクターを封入または担持させる方法である。この方法は、目的物の生体内挙動および輸送に関与する諸過程を、キャリアー自体の物理化学的性質に依存させることにより、生理活性物質を所望の臓器 (標的臓器)、細胞 (標的細胞) または細胞内器官 (標的器官) に到達せしめることを特徴とする。この方法におけるキャリアーとしては例えば、リボソーム (F. Ledley et al., Human Gene Therapy 6, 1129-1144 (1995))、タンパク質 (Human Gene Therapy 5, 429 (1994))、ペプチド (Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America 90, 893 (1993))、合成高分子化合物 (Tang et al., Human Gene Therapy 4, 823-832 (1997))、および (再構成) センダイウイルス (Exp. Cell Res. 159, 399 (1985)) などを例示することができる。

【0004】

キャリアーとしてリボソームを用いる方法には、様々な工夫が施されてきた。近年、DNA分子がポリアニオンであることに着目し、DNA分子と静電的に親和性を有し、容易に複合体を形成できるポリカチオン性脂質をリボソームとして用い、標的細胞に該DNA分子を導入する試みがなされている。このようなカチオン性脂質としては、リポフェクチン、1, 2-ジオレイルオキシ-3- (トリメチルアンモニオ) プロパン (DOTAP)、1, 2-ジミリスチルオキシプロピル-3-ジメチ

ルヒドロキシエチルアンモニウムブロミド (DMRIE) (F. Ledley et al., *Human Gene Therapy* 6, 1129-1144 (1995)), トランスフェクタム等が知られている。しかしながら、カチオン性脂質はエンドサイトーシス過程を経て細胞内に取り込まれるとリソソーム等により分解されやすく、遺伝子の導入効率が低いという問題があった。さらに、導入効率を高めるために使用量を多くすると細胞障害性を示すという点も問題であった。

【0005】

これらの問題を解決するために、カチオン性高分子を用いる試みもなされている。例えば、Kimらはポリリジンに疎水基を結合させ、これを疎水性相互作用により血漿タンパク質へ導入後、DNA分子と静電的に結合させる遺伝子導入システムを開示している (米国特許第5,679,559号)。また、Zhouらは疎水基を導入したポリリジンとリン脂質からなるリポソームを調製した (X. Zhou et al., *Biochimica et Biophysica Acta*. 1065, 8-14 (1991), X. Zhou et al., *ibid.* 1189, 195-203 (1994))。Zhouらのリポソームは、ポリ-L-リジンを用いることにより細胞傷害性を低減させ、脂質残基を導入することにより標的細胞へのDNA／リポソーム複合体の親和性を向上させることに成功した。しかしながら、細胞へ効率良く導入するためには、細胞を予め化学物質で処理することが必要であった。また、国際公開第97/45442号パンフレットにおいては、コレステロール基を導入したポリアミンを含むリポソームを開示している。

【0006】

その他のカチオン性高分子として、ポリアルキレンイミン、特にポリエチレンイミン (PEI) が知られている (N. Oku et al., *J. Biochem.* 100, 935-944 (1986), N. Oku et al., *Biochemistry* 26, 8145-8150 (1987), Suh et al., *Bioorganic Chem.* 22, 318-327 (1994))。ポリエチレンイミンは直鎖または分岐型のポリマー分子であり、その分子中にプロトン化したアミノ基を有し、これを介してDNA分子と結合することができ、また、細胞標的物質または細胞膜変性剤を用いる必要がないことから、遺伝子導入において応用されている (W096/02655, O.Boussif et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7297-7301 (1995), B. Abdallah et al., *Hum. Gene Ther.* 7, 1947-1954 (1996), Lambert et al., *Mol.*

Cell Neurosci. 7, 239-246 (1996), R.Kircheis et al., Gene Ther. 4, 409-418 (1997), A. Baker et al., Gene Ther. 4, 773-782 (1997), A. Baker et al., Nucleic Acids Res. 25, 1950-1956 (1997), Durmort et al., Gene Ther. 4, 808-814 (1997), Tang et al., Gene Ther. 4, 823-832 (1997), A. Boletta et al., Hum. Gene Ther. 8, 1243-1251 (1997), Ferrari et al., Gene Ther. 4, 1100-1106 (1997)). ポリエチレンイミンの細胞内導入機構について, Demeneixらによる仮説が報告されている (Artificial Self-Assembling Systems for Gene Delivery, ed. by P.L. Felgner et al., p.146-151, ACS conference proceeding series, 1996)。

【0007】

しかしながら、疎水基を導入したポリエチレンイミンを遺伝子導入のための担体として用いた報告例はない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、負電荷を有する物質の細胞内への導入において、より導入効率が高く、細胞に対して毒性の少ない、カチオン性高分子を構成成分とする組成物、および該組成物を用いた負電荷を有する物質の細胞内への導入法を提供することを課題とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために、複数の疎水基を導入したポリエチレンイミンを構成成分とする新規な輸送担体を構築し、この担体を利用した細胞内への遺伝子導入につき検討を行った結果、この担体を利用することにより高い導入効率で、かつ極めて少ない毒性で、細胞内に遺伝子を導入することができることを見出した。

【0010】

具体的には、本発明者らは、ポリエチレンイミンに複数のセチル基を導入し、図1に示すセチル化ポリエチレンイミンを調製し、これにリン脂質であるホスファチジルエタノールアミンまたはホスファチジルコリンを混合して、担体組成物



を調製した。そして、得られた組成物に蛍光タンパク質（GFP）遺伝子が挿入されたプラスミドを混合し、これにより形成させた複合体をCOS-1細胞に導入して、蛍光強度の測定による遺伝子導入効率の検討、および生細胞の細胞密度の測定による細胞毒性の検討を行った。その結果、セチル化ポリエチレンイミンを構成成分とする担体組成物を用いた場合には、従来用いられていたリポソームを用いた場合と比較して、顕著に遺伝子導入効率が高く、しかも細胞に対する毒性が極めて低いことを見出した。

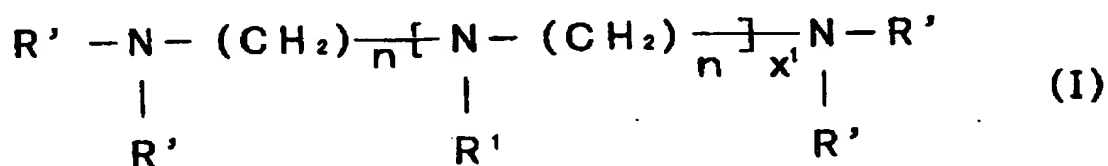
【0011】

即ち、本発明は、複数の疎水基を導入したポリアルキレンイミンまたはその塩を構成成分とする組成物、および該組成物を用いた遺伝子導入法に関し、より具体的には、

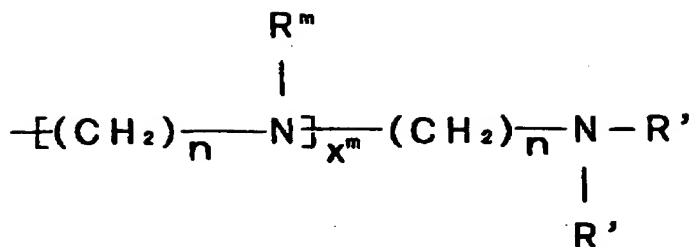
（１） 疎水性基が一分子中に２個以上導入されたポリアルキレンイミンまたはその塩を含む組成物、

（２） 疎水性基がコレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、またはリン脂質残基である、（１）に記載の組成物、

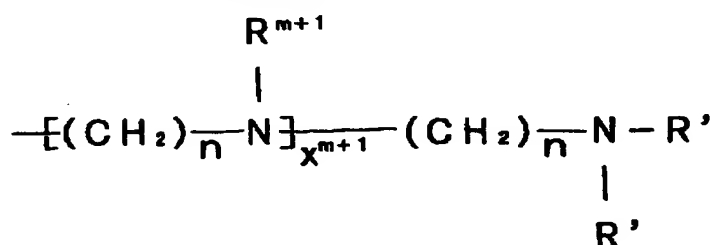
（３） 疎水性基が一分子中に２個以上導入されたポリアルキレンイミンが下記構造式(I)で表される化合物である、（１）に記載の組成物、



（式中、R' は、水素、アルキロキシ基、またはアルコキシ基を表し、同一の窒素原子に結合する２つのR' は同一であっても異なってもよく、R<sup>1</sup>は水素、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、リン脂質残基、または次式を表し、



$R^m$ は水素、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、リン脂質残基、または次式を表す。



また、式中、 $n$ 、 $x^1$ 、 $x^m$ および $x^{m+1}$ は自然数を表す。）

(4) ポリアルキレンイミンがポリエチレンイミンである、(1)から(3)のいずれかに記載の組成物、

(5) さらにリン脂質を含む、(1)から(4)のいずれかに記載の組成物、

(6) リン脂質が中性リン脂質または酸性リン脂質である、(5)に記載の組成物、

(7) リン脂質がホスファチジルエタノールアミン骨格またはホスファチジルコリン骨格を有する、(5)に記載の組成物、

(8) リン脂質がジオレイルホスファチジルエタノールアミンまたはホスファチジルコリンである、(7)に記載の組成物、

(9) 負電荷を有する生理活性物質と(1)から(8)のいずれかに記載の組成物を含む複合体、

(10) 負電荷を有する生理活性物質が核酸またはその誘導体である、(10)に記載の複合体、

(11) (9)または(10)に記載の複合体を細胞に接触させる工程を含む、負電荷を有する生理活性物質を細胞内へ導入する方法、

(12) (5)に記載の組成物を製造するための、リン脂質および疎水性基が

一分子中に2個以上導入されたポリアルキレンイミンまたはその塩を含むキットに関する。

## 【0012】

## 【発明の実施の形態】

本発明は、疎水性基が一分子中に2個以上導入されたポリアルキレンイミンまたはその塩を含む組成物に関する。本発明において「ポリアルキレンイミン」とは、プロトン化したアミノ基を有するポリマー分子を指し、直鎖型であっても分岐型であってもよい。ポリアルキレンイミンの構成単位であるアルキレンモノマーは、炭素数が1～10の低級アルキレンイミンであることが好ましく、水に対する溶解性の観点から炭素数が1～3の低級アルキレンイミンであることがさらに好ましい。合成の容易性の観点からは、特にポリエチレンイミンであることが好ましい。ポリエチレンイミンは、当業者に公知の方法により製造することができる（例えば、特公昭43-8828号公報、米国特許第4,032,480号明細書、および米国特許第4,467,115号参照）。また、市販品（例えば、ポリエチレンイミン（分子量600,商品名エポミン（株式会社日本触媒製）、商品名ExGen 500（Euromedex社製）等）を用いてもよい。本発明において用いられるポリエチレンイミンの平均分子量は、通常、200から1,000,000のであり、好ましくは300から500,000であり、さらに好ましくは500から100,000である。

## 【0013】

ポリアルキレンイミンに導入する疎水性基としては、ポリアルキレンイミンとリン脂質との親和性を高めるものであれば特に制限はなく、例えば、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、または飽和もしくは不飽和のアシル基、またはリン脂質残基が挙げられる。好ましくは、セチル基、ステアシル基、オレイル基である。ポリアルキレンイミンには、負電荷物質の細胞内への導入効率を高めるために一分子中に少なくとも2つの疎水性基が導入される。但し、疎水性基の導入数を過剰に増加させると、ポリアルキレンイミンの水に対する溶解性が低下してしまうため好ましくない。分子内における好適な疎水性基の数は、当業者であれば、適宜選択することが可能である。ポリアルキレンイミンに導入

される疎水性基は、スパーサーを介してポリアルキレンイミンに結合していてもよい。スパーサーとしては、中性の水溶性分子が好ましく、例えば、アミノ酸、ペプチド、ポリアミノ酸、タンパク質、糖、さらにポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、デキストラン誘導体等の合成高分子およびそれらの誘導体を用いることができる。負電荷物質を輸送するための担体として用いる場合、ポリアルキレンイミンは塩を形成していてもよい。ポリアルキレンイミンの塩としては、例えば、塩酸塩、硫酸塩、リン酸塩、炭酸塩、ギ酸塩、シュウ酸塩、クエン酸塩、コハク酸塩等が挙げられるが、これらに制限されない。

## 【0014】

これにより調製された複数の疎水性基が導入されたポリアルキレンイミンは、単独で負電荷物質を輸送するための担体として用いることも可能であるが、さらに、リン脂質と混合することにより、リポソームを形成させて担体として用いることも可能である。疎水基はリン脂質内部に安定化する性質を有するため、疎水基が導入されたポリアルキレンイミンはリポソームにおいて安定的に存在しうると考えられる。リポソームの形成に用いられるリン脂質としては、それ自体で、負電荷を有する生理活性物質と相互作用をしない中性または酸性の脂質であることが好ましい。リン脂質は、天然由来であっても、合成されたものであってもよい。本発明に用いられるリン脂質のアルキル側鎖としては、炭素数12~18のものまたはオレイル基が好ましい。リン脂質としては、例えば、ホスファチジルエタノールアミン骨格を有するジオレオイルホスファチジルエタノールアミンやホスファチジルコリン骨格を有するホスファチジルコリン（例えば、卵黄由来、大豆由来あるいは合成のもの）が好適に用いられる。リン脂質とポリエチレンイミンの混合比は、混合物が負電荷物質と電気的親和性を有する程度に正に帯電する範囲であれば、特に制限はない。好ましい混合比は当業者であれば、適宜選択することができる。

## 【0015】

また、本発明は負電荷を有する生理活性物質と上記組成物とを含む複合体に関する。負電荷を有する生理活性物質としては、多価の負電荷を有する生理活性物

質であれば特に制限はない。多価の負電荷を有する生理活性物質としては、例えば、核酸およびその誘導体が挙げられる。核酸としては、環状および直鎖状の1本鎖もしくは2本鎖のデオキシリボ核酸であっても、リボ核酸であってもよい。核酸の誘導体としては、例えば、ホスフォロチオエート、ホスフォロジチオエート等が例示される。本発明の複合体において、負電荷を有する生理活性物質に対する上記組成物の混合比は、電荷比で1/10当量から20当量であることが好ましい。好適な混合比は、当業者であれば適宜選択することができる。複合体の粒形は、200 nm以下であることが好ましく、100 nm以下であることがさらに好ましい。本発明の複合体の製造において、他の補助剤は特に必要ないが、補助剤としては、例えば、ホスファチジルエタノールアミンまたはホスファチジルコリン、脂肪酸など両親媒性の分子等を用いることも可能である。

## 【0016】

負電荷物質の輸送において本発明のポリアルキレンイミンを単独で用いる場合には、負電荷物質と直接混合して複合体を形成させた後、公知の方法 (O. Boussif et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 7297-7301 (1995)) に従って負電荷物質を細胞内へ導入することができる。一方、本発明のポリアルキレンイミンをリン脂質と混合してリポソームを形成させる場合には、まず、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE、日本精化株式会社製) またはホスファチジルコリン (eggPC、日本精化株式会社製) などのリン脂質と本発明のポリアルキレンイミンを混合し、これを公知の方法 (N. Oku et al., Biochim. Biophys. Acta. 1280, 149-154, (1996)) に従いリポソームの水分散液を調製する。この際、リポソームは膜安定化剤としてコレステロール等のステロール類を、抗酸化剤としてトコフェロール、ビタミンEなどを含んでいてもよい。リポドマイクロスフェアの場合、本発明のポリアルキレンイミンと大豆油と界面活性剤とを加えて公知の方法 (F. Liu et al., Pharmaceutical Res. 13, 1642-1646 (1996)) により目的のリポドマイクロスフェアを得ることができる。これを負電荷物質と混合した後、細胞に接触させることにより、負電荷物質を細胞内へ導入することができる。

## 【0017】

また、本発明はリポソームを調製するための、リン脂質および疎水性基が一分

子中に2個以上導入されたポリアルキレンイミンまたはその塩を含むキットに関する。本発明のキットにはリン脂質および疎水性基が一分子中に2個以上導入されたポリアルキレンイミンまたはその塩の他に、さらに、上記の膜安定化剤、抗酸化剤を含んでいてもよい。本発明のキットに含まれるリン脂質標品及びポリアルキレンイミン標品の最終形態としては、冷蔵、冷凍または凍結乾燥品とすることが可能である。凍結乾燥品の場合は安定化剤としてソルビトール、シュクロース、アミノ酸及び各種タンパク質等を含んでいてもよい。

【0018】

## 【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明は、これらの実施例に限定されるものではない。

【0019】

## 【実施例1】 ポリエチレンイミンの精製

市販のポリエチレンイミン（分子量600，商品名エポミンSP-006，株式会社日本触媒製）2gを100mlの蒸留水で溶解し、分画分子量500の限外濾過膜（UH-05，東洋濾紙製；限外濾過装置はアミコン社製、攪拌式セル 8,400型）で、 $2-3\text{kg/cm}^2$ の窒素気流下、1000mlの蒸留水で限外濾過を行った。不純物を除いた限外濾過処理液（約20-30ml）を凍結乾燥して精製ポリエチレンイミンを得た。

【0020】

## 【実施例2】 セチル化ポリエチレンイミンの合成

20mlのクロロホルム中、1gの精製ポリエチレンイミン（分子量600）と1.62gのセチルブロマイドを混合し（モル比、1:2）、1mlのトリエチルアミンを添加して還流させた。次いで、分画分子量1000の限外濾過膜（YM1、アミコン社製）を用い未反応のポリエチレンイミンを除去した。凍結乾燥したセチル化ポリエチレンイミンの収率は70.4%であった。セチル化ポリエチレンイミンのセチル基の導入数はNMRで検討した。即ち、1.3ppm付近のセチル基と2.5-3.5ppm付近のポリエチレンイミンのプロトン比は1分子のポリエチレンイミンにセチル基3分子が結合していることを支持した。合成したセチル化ポリエチレンイミンを図1に示す。

【0021】

### 〔実施例3〕 リポソームの調製

リポソームを調製するために、予め10mM セチル化ポリエチレンイミンのクロロホルム 溶液と10mM ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE、日本精化株式会社製) の クロロホルム溶液を調製した。用いた脂質組成はセチル化ポリエチレンイミン/DOPE=0.65/1 (モル比)とした。この脂質をナス型フラスコに取りクロロホルムに溶解した後、ロータリーエバポレーターでクロロホルムを減圧留去し脂質フィルムを作製した。この脂質フィルムを高真空下で1時間乾燥した後、1mM溶液となるようにDMEM (ギブコBRL社製) で水和した。その後、凍結融解を3回繰り返し、リポソームをバス型ソニケーターで10分間超音波処理した。リポソームは安定ではあるが用時調製した。

#### 【0022】

また、比較例として、セチル化ポリエチレンイミンの代わりに1、2-ジミリスチルオキシプロピル-3-ジメチルヒドロキシエチルアンモニウムブロミド (DMRIE) または1、2-ジオレオイルオキシ-3- (トリメチルアンモニオ) プロパン (DOTAP) を用いて上記と同様にリポソームを得た。

#### 【0023】

### 〔実施例4〕 プラスミドDNA/リポソーム 複合体の作製

プラスミドDNAはpEGFP-C1 (クローンテック社製) を用いた。このプラスミドは、レポータ遺伝子としてGFP (green fluorescent protein) をコードしているため、その遺伝子発現はGFPの蛍光強度を測定することで定量できる。プラスミドを大腸菌で調製、塩化セシウム平衡密度勾配遠心法で精製し、TE 緩衝液 (pH 7.5) に2 $\mu$ g/mlの濃度で溶解した。プラスミドDNA量を一定にし、1.5mlエッペンドルフチューブにとり、各比率の1mM リポソーム溶液を添加し、100 $\mu$ lとなるようDMEMを加え、室温で20分間インキュベーションした。

#### 【0024】

### 〔実施例5〕 遺伝子導入

COS-1細胞を1 $\times 10^5$  cells/ディッシュで35mmディッシュにまき、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>存在下で一夜培養した。DMEMで2回洗浄した後、調製したリポソーム/プラスミドDNA複合体を血清無添加のDMEMで希釈し、全液量250 $\mu$ lとなるように調製し細胞

に添加した。添加後、37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で3時間インキュベーションした。3時間後、リポソーム/プラスミドDNA複合体溶液を除去し、血清無添加のDMEMで2回洗浄後、10%FBS-DMEM 2mlを加えて48時間培養した。

## 【0025】

## 〔実施例6〕 導入遺伝子発現 (GFP)の定量

上記の48時間培養した細胞の培養液を除き血清無添加のDMEMで2回洗浄後、最終濃度1%の濃度でTritonX100溶液を添加後、室温で30分インキュベーションして可溶化した。細胞溶液を懸濁してエッペンドルフチューブに移し3000rpmで10分間遠心した。遺伝子発現量はEx 493nm、Em 510nmの蛍光強度測定によった。この結果を図2に示す。本発明の組成物を用いた場合は対照のDMRIE、DOTAPに比べて遺伝子発現は2倍以上高かった。

## 【0026】

## 〔実施例7〕 比較リポソームを用いた場合の導入遺伝子発現

実施例3でDOPEの代わりに卵黄由来のホスファチジルコリン (eggPC) を用いた以外は実施例1～6と同様にして導入遺伝子発現の定量を行った。図3に結果を示した。図3からわかるように、eggPCを用いた場合、DOPEに近似した遺伝子発現を示した。

## 【0027】

## 〔実施例8〕 細胞毒性の検討

COS-1細胞を24ウェルプレート(コーニング社製)に1ウェルあたり1mlずつ添加し、37℃、5%CO<sub>2</sub>存在下で一晩培養しコンフルエントとした。DMEMでウェルを2回洗浄後、調製したプラスミドDNA/リポソーム複合体溶液を様々な濃度で1ウェルあたり200μlずつ添加した。添加後、37℃、5%CO<sub>2</sub>存在下で3時間インキュベーションした。また、対照としてDMEMのみ、リポソーム溶液のみについても同様に行った。

## 【0028】

## 〔実施例9〕 細胞密度の測定

細胞毒性についてはアラマーブルー (alamerBlue、Biosource International 社、輸入元は岩城硝子株式会社) を用いて行った。まず、それぞれのサンプル溶



液を除去し、各ウェルあたり血清無添加のDMEM 200  $\mu$ lおよび5倍希釈したアラマ  
ーブルー溶液を50  $\mu$ lずつ添加した。添加後、37°C、5%CO<sub>2</sub>存在下で1時間インキ  
ュベーションした。1時間後、各ウェルの溶液を1.5mlエッペンドルフチューブに  
とり、750  $\mu$ lのPBS(-)を加えて1mlし、Ex 535nm、Em 583nmの蛍光強度測定を行  
った。その結果を図4、図5、図6に示す。本発明の組成物を用いた場合には、従  
来のリポソームを用いた場合に比べて特に高濃度の複合体溶液において著しく細  
胞毒性が低下していた。

## 【0029】

## 【発明の効果】

本発明により、複数の疎水基を導入したポリアルキレンイミンを構成成分とす  
る組成物、および該組成物を用いた遺伝子導入法が提供された。これにより、従  
来のカチオン性高分子に比し、より高い効率で、かつ細胞に対し低毒性で、負電  
荷の生理活性物質を細胞内へ輸送することが可能となった。

## 【図面の簡単な説明】

## 【図1】

実施例において用いた疎水基を導入したポリエチレンイミンの構造を示す図で  
ある。

## 【図2】

本発明の組成物と従来のリポソームを用いた場合のプラスミドとリポソームと  
の荷電比を変えた時のGFP遺伝子発現を表わす図である。図中、PCLはトリセチル  
-PEI:DOPE (0.65:1,モル比, ポリエチレンイミン分子量:600)を示す。同様にD  
MRIE:DOPE(1:1,モル比)、DOTAP:DOPE(1:1,モル比)を示し、細胞はCOS-1を用い  
た。また、プロット上の棒線は $\pm$ SDを示す。

## 【図3】

リン脂質の遺伝子発現に及ぼす影響を表わす図である。図中、DOPE-PCLはトリ  
セチル-PEI:DOPE (0.65:1,モル比)を示す。eggPC-PCLはトリセチル-PEI:eggP  
C (0.65:1,モル比)を示す。

## 【図4】

本発明のリポソーム単独またはプラスミド複合体濃度を変えた時の細胞毒性を

表わす図である。図中、PCLはトリセチル-PEI:DOPE (0.65:1,モル比、PEI分子量600)を示す。細胞はCOS-1を用いた。また、棒グラフ上部の棒線は±SDの+側を示す。

【図5】

従来のリボソーム (DMRIE)の単独またはプラスミド複合体の濃度を変えた時の細胞毒性を表わす図である。図中、DMRIE lipo.はDMRIE:DOPE(1:1,モル比)を示す。細胞はCOS-1を用いた。また、棒グラフ上部の棒線は±SDの+側を示す。

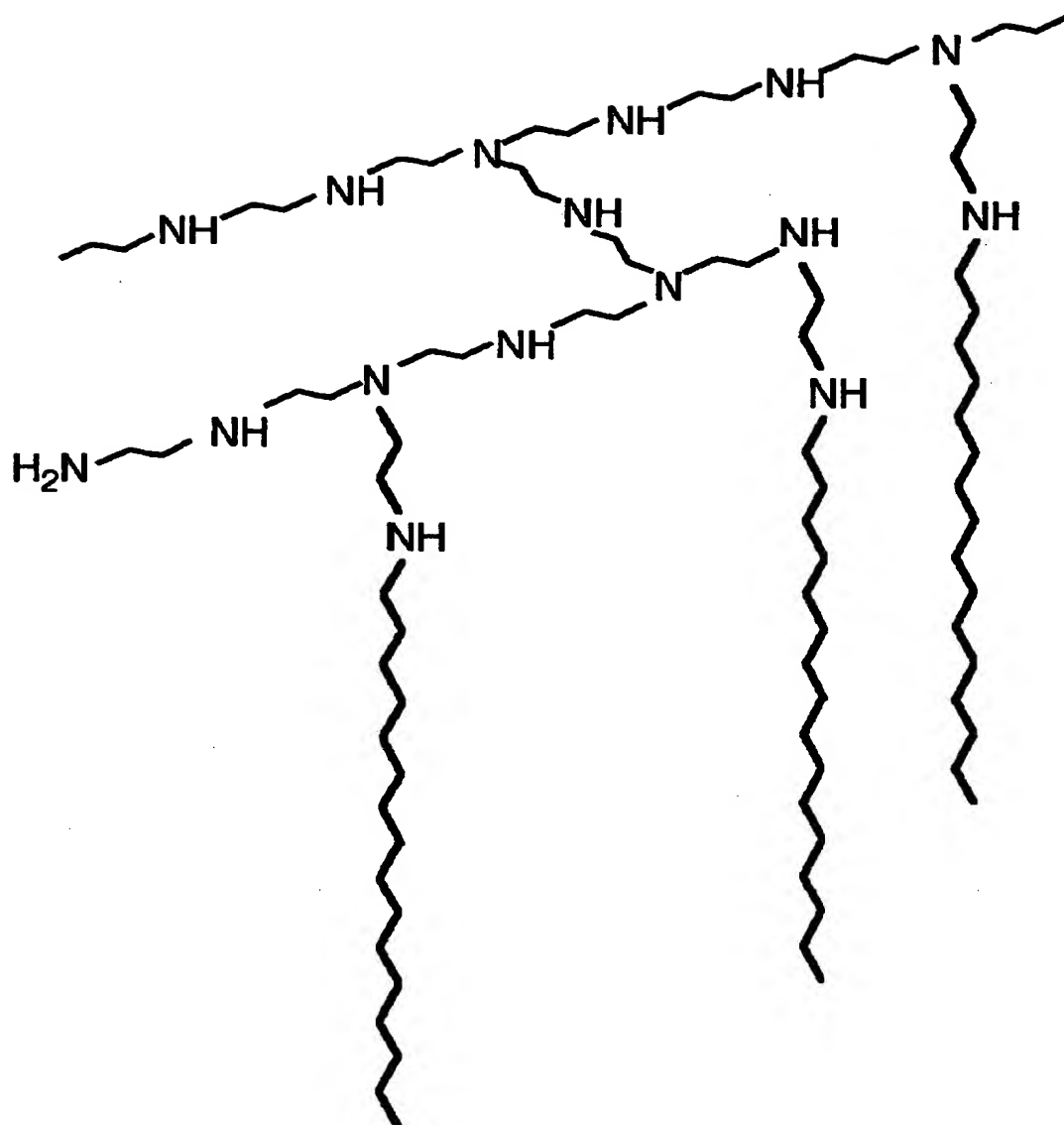
【図6】

従来のリボソーム (DOTAP)の単独またはプラスミド複合体の濃度を変えた時の細胞毒性を表わす図である。図中、DOTAP lipo.はDOTAP:DOPE(1:1,モル比)を示す。細胞はCOS-1を用いた。また、棒グラフ上部の棒線は±SDの+側を示す。

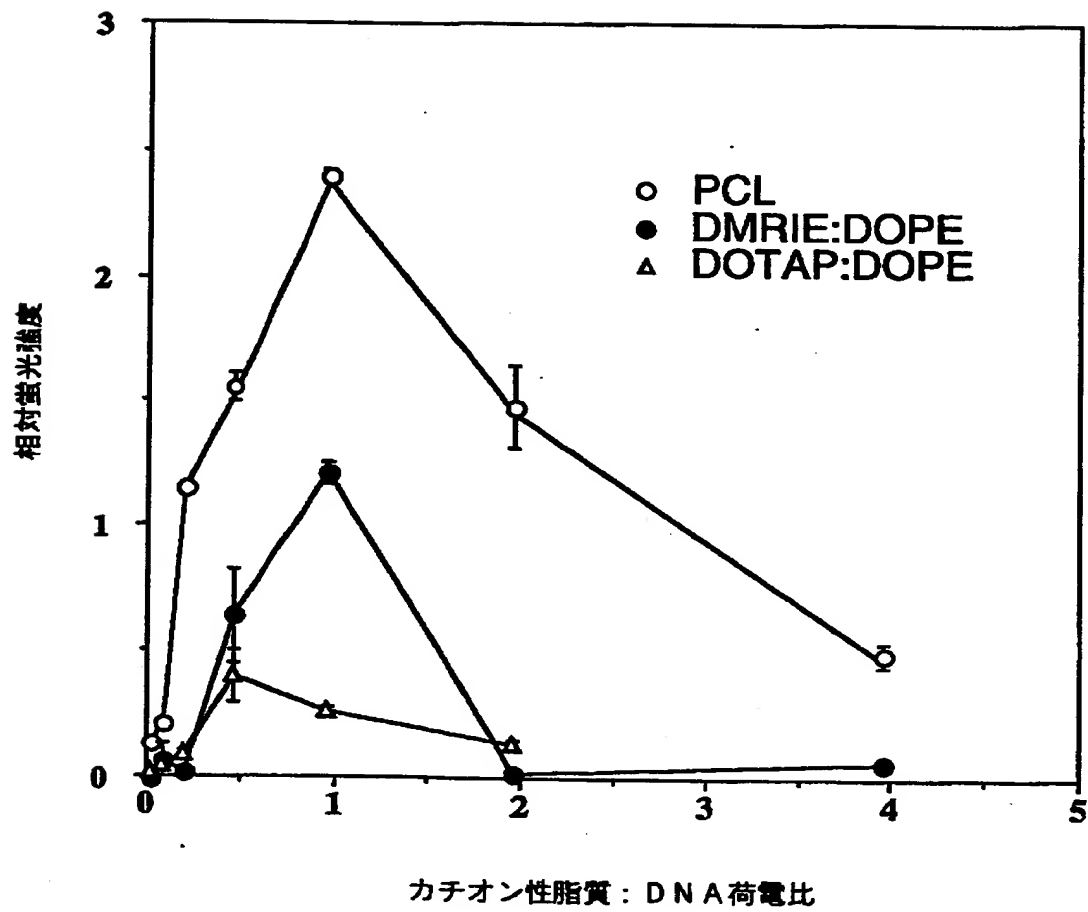
【書類名】

図面

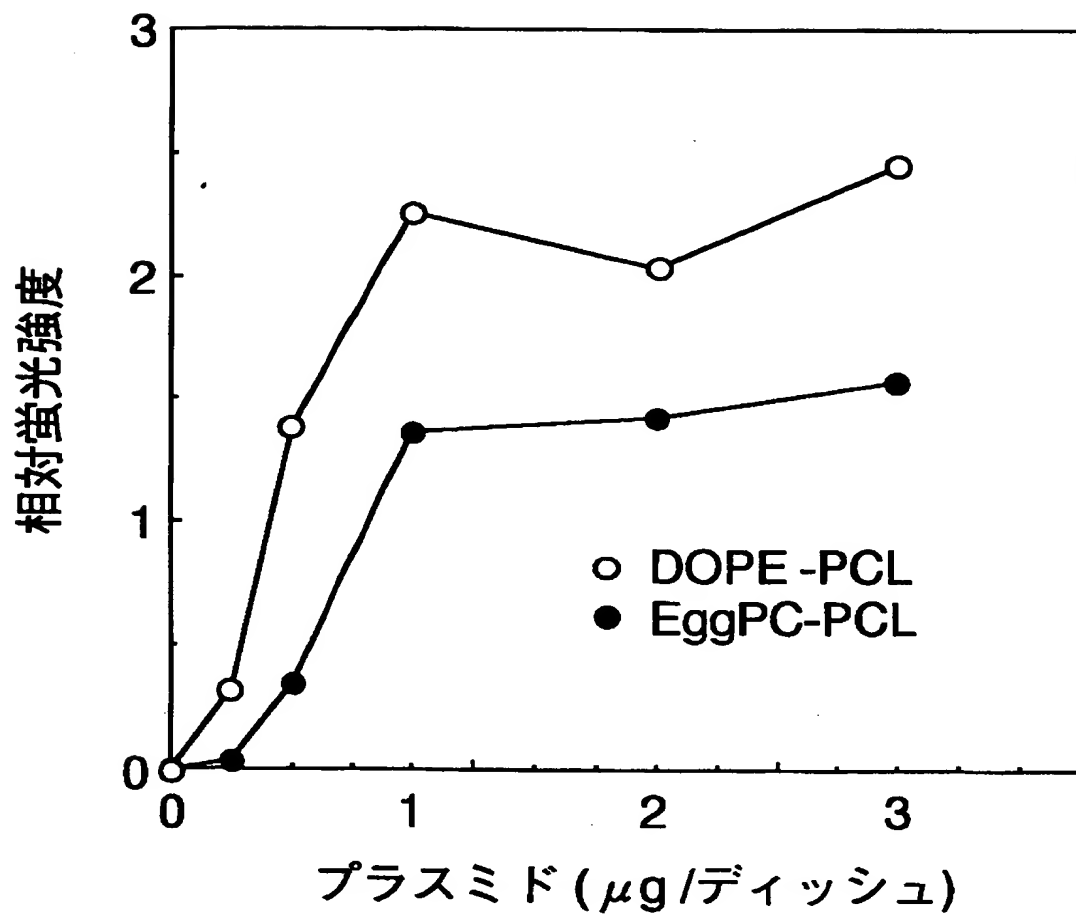
【図 1】



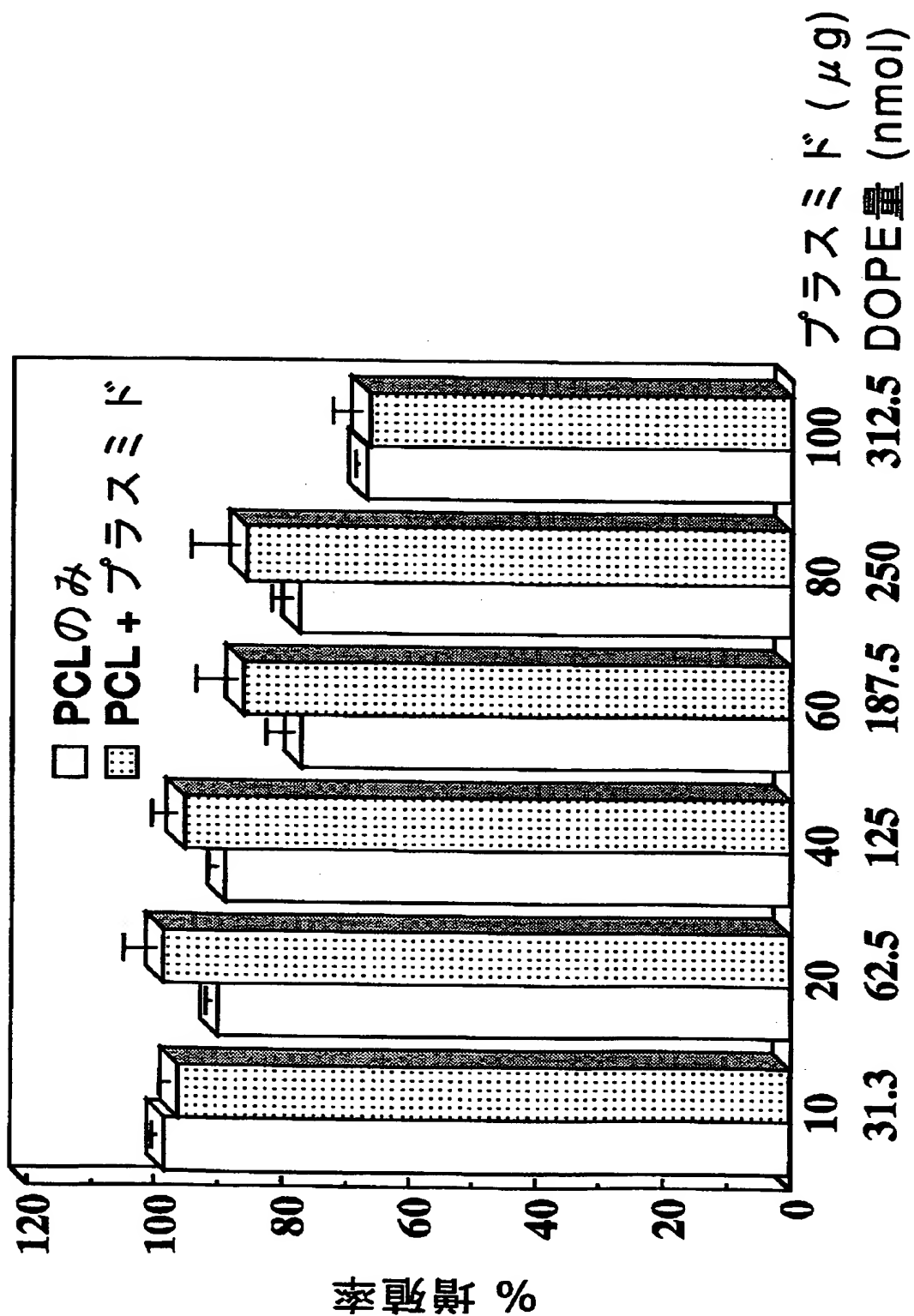
【図2】



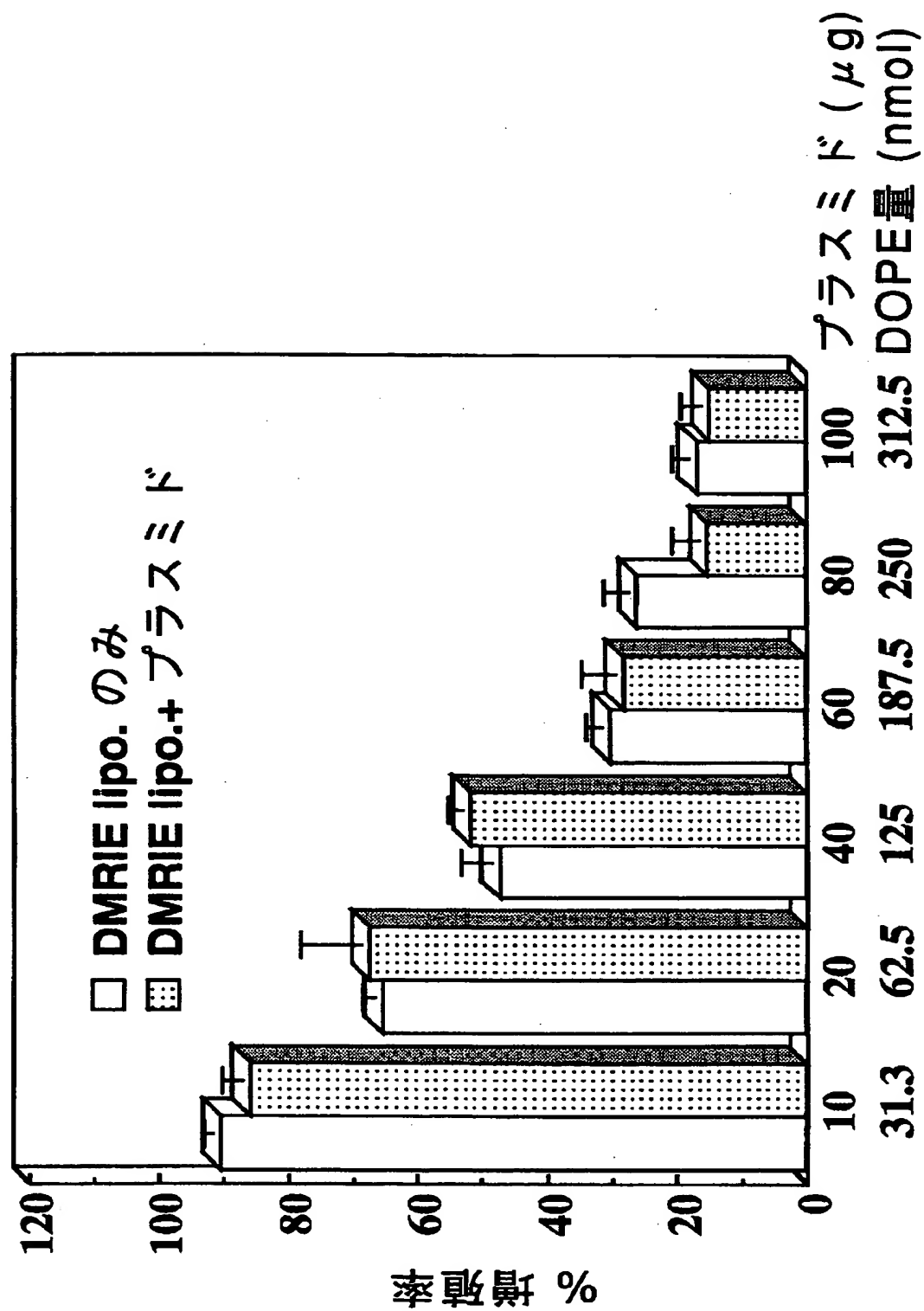
【図3】



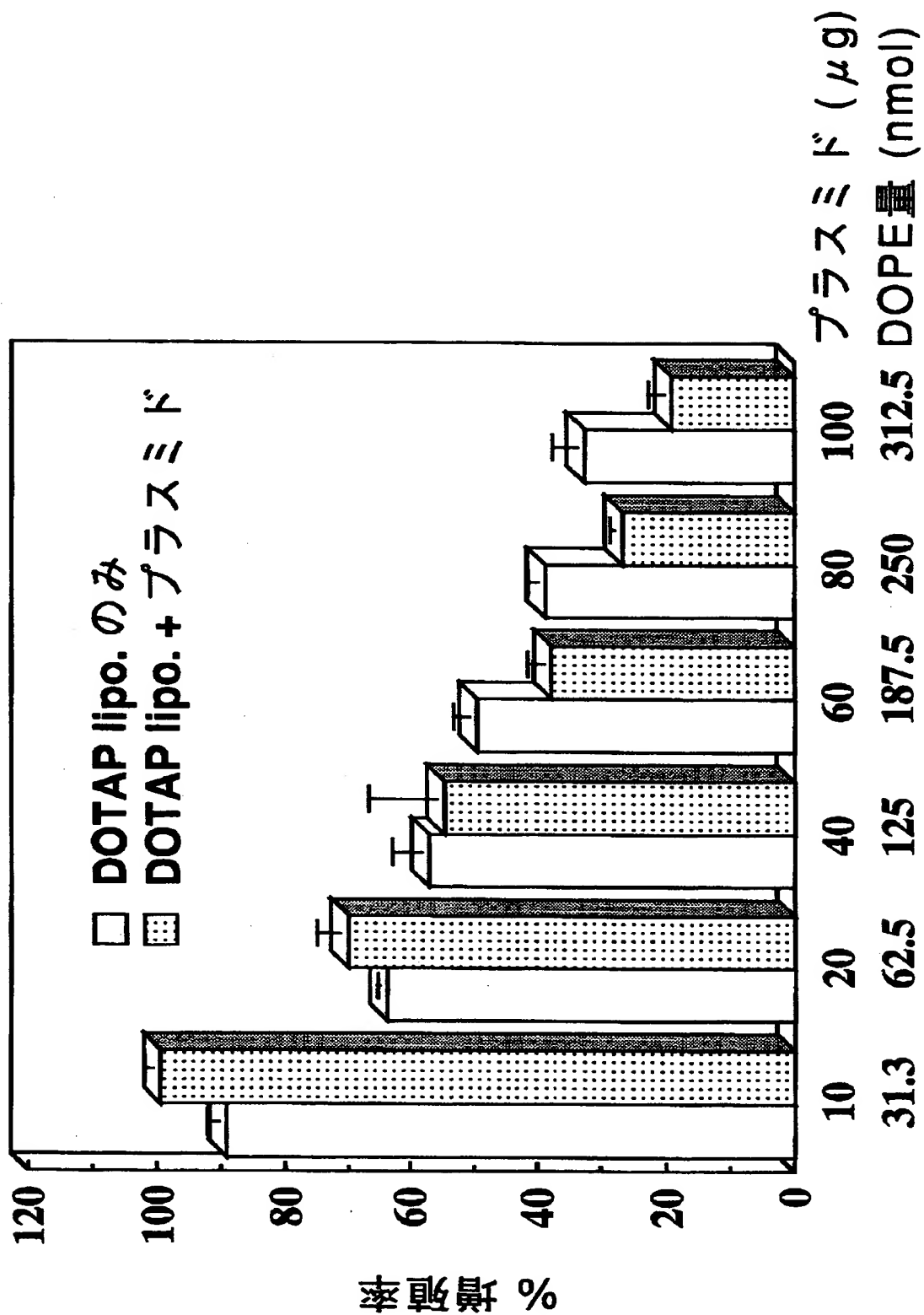
【図 4】



【図 5】



【図6】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 負電荷を有する物質の細胞内への導入において、より導入効率が高く、細胞に対して毒性の少ない、カチオン性高分子を構成成分とする組成物、および該組成物を用いた遺伝子導入法を提供することを課題とする。

【解決手段】 複数の疎水基を導入したポリエチレンイミンを構成成分とする新規な輸送担体を構築し、この担体を利用した細胞内への遺伝子導入につき検討を行った結果、この担体を利用することにより高い導入効率で、かつ極めて少ない毒性で、細胞内に遺伝子を導入することができることを見出した。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 595155107  
【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号  
【氏名又は名称】 株式会社ディナベック研究所

【代理人】 申請人

【識別番号】 100102978  
【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階  
清水国際特許事務所

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774  
【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階  
清水国際特許事務所

【氏名又は名称】 橋本 一憲

特平10-048187

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [595155107]

1. 変更年月日 1995年11月 1日

[変更理由] 新規登録

住 所 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号

氏 名 株式会社ディナベック研究所

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference D3-001PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/00954	International filing date (day/month/year) 26 February 1999 (26.02.99)	Priority date (day/month/year) 27 February 1998 (27.02.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C08L 79/02, A61K 45/00, 48/00, 47/48 // C12N 15/00		
Applicant DNAVEC RESEARCH INC.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 01 September 1999 (01.09.99)	Date of completion of this report 16 February 2000 (16.02.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/00954

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

ational application No.

PCT/JP99/00954

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	3-25	YES
	Claims	1-2	NO
Inventive step (IS)	Claims	18-25	YES
	Claims	1-17	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-25	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations**

Based on document 1 [Khmelnitsky, Y. L., et al., "Reversed micelles of polymeric surfactants in nonpolar organic solvents," section entitled "Materials and Methods," Eur. J. Biochem., Vol. 206, No. 3 (1992), pages 737 to 745] cited in the international search report, the subject matter of Claims 1 and 2 does not appear to be novel. Because the cetylated polyethylene imine described in the "Methods" section of document 1 can be obtained by the same manufacturing method as that described in the Specification of this application, this examination finds that the inventions of Claims 1 and 2 are the same as the inventions described in document 1.

Based on document 1, document 2 [JP, 43-8828, B (The Dow Chemical Co.)], document 3 [JP, 52-10400, A (Institut Neftekhimicheskogo Sinteza Imeni A. V. Toncheva Akademii Nauk SSSR)] and document 4 [JP, 59-86626, A (Institut Neftekhimicheskogo Sinteza Imeni A. V. Toncheva Akademii Nauk SSSR)] cited in the international search report, the subject matter of Claims 3-17 does not appear to involve an inventive step. Obtaining the composition described in Claims 3-17 by using the substances in documents 2-4 as starting materials for the cetylated polyethylene imine described in the "Methods" section of document 1 can easily be performed by persons skilled in the art.

THIS PAGE BLANK (USPTO)